

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

24.09.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年10月 8日

REC'D 13 NOV 2003

出願番号
Application Number: 特願 2002-294528

WIPO

PCT

[ST. 10/C]: [JP 2002-294528]

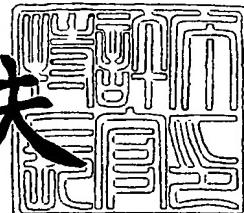
出願人
Applicant(s): 三井化学株式会社

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年10月31日

特許長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 P0001612

【提出日】 平成14年10月 8日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市北区あいの里五条三丁目一番
北海道教育大学札幌校内

【氏名】 森田 みゆき

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1144 番地 三井化学株式会社内

【氏名】 伊藤 潔

【特許出願人】

【識別番号】 000005887

【氏名又は名称】 三井化学株式会社

【代表者】 中西 宏幸

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005278

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 イネ由来ペルオキシダーゼの利用法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 洗液中で染色された布を含む複数の布と一緒に洗濯および／またはすぐ場合において、染色された一方の布から他の布への纖維染料の移行を防止する方法であって、該洗液に過酸化水素の存在下でイネ由来ペルオキシダーゼを作用させることを特徴とする方法。

【請求項 2】 溶液または分散液中の纖維染料を漂白する方法であって、前記溶液または分散液に過酸化水素の存在下でイネ由来ペルオキシダーゼを作用させることを特徴とする方法。

【請求項 3】 イネ由来ペルオキシダーゼが、イネモミガラ由来のペルオキシダーゼであることを特徴とする請求項 1 または請求項 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4】 過酸化水素が過酸化水素前駆体としてまたは過酸化水素を発生する酵素系により供給されることを特徴とする請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】 過酸化水素前駆体が過ホウ酸塩または過炭酸塩である請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】 活性化剤の存在下において実施することを特徴とする請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】 界面活性剤の存在下において実施することを特徴とする請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】 纖維染料が合成染料、天然染料又は天然同一性染料である請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】 イネ由来ペルオキシダーゼ、並びに、過酸化水素、過酸化水素の前駆体、または、過酸化水素を発生せしめることのできる酵素系を含んでいる洗剤組成物もしくは漂白剤組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、高温での反応性並びに安定性に優れているイネ由来ペルオキシダーゼ、より具体的には、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼの利用方法に関する。

より特定的に言うと、本発明は、イネ由来ペルオキシダーゼを用いた溶液中の着色物質（染料など）の分解（脱色・漂白）方法の提供に関する。

【0002】

すなわち、本発明は、洗液中で染色された布を含む複数の布と一緒に洗濯および／またはすぐ場合において、染色された一方の布から他の布への纖維染料の移行を防止する方法（以下、染料移動阻止方法と呼ぶ）に関する。さらに、本発明は、溶液または分散液中の纖維染料を漂白する方法に関する。また、本発明は、イネ由来ペルオキシダーゼを含有する洗剤組成物もしくは漂白剤組成物に関する。

【0003】**【従来の技術】**

ペルオキシダーゼ（E. C. 1. 11. 1. 7）は、植物組織、動物組織、血液等に広く分布しており、さらに、いくつかの微生物も同酵素を分泌することが以前より確認されている。該酵素は、過酸化水素による基質（電子又は水素供与体）の酸化触媒として作用する酵素である。尚、ペルオキシダーゼは、補欠分子族並びに反応形式の違いによりいくつかのタイプに分類されるが、工業的には、補欠分子族としてヘムを含んでいるヘム型ペルオキシダーゼの利用が最もよく知られている。

【0004】

次に上述のヘム型ペルオキシダーゼについて説明する。ヘム型ペルオキシダーゼは、3価の鉄イオンを含むヘム蛋白質であり、過酸化水素や有機過酸化物の存在下で種々の化合物の酸化を触媒する酵素である。その作用機作については、以下のステップ1～ステップ3のように、過酸化物の存在下で種々の化合物の酸化的な脱水素反応を触媒すると説明されている。

【0005】

ステップ1：ペルオキシダーゼ+H₂O₂→コンプレックスI

ステップ2：コンプレックスI+A H（還元型供与体）

→コンプレックスII+A（酸化型供与体）

ステップ3：コンプレックスII+A H→ペルオキシダーゼ+A+2H₂O

【0006】

ヘム型ペルオキシダーゼの代表例としては、例えば西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ、大豆由来ペルオキシダーゼ、コルプリヌス・シネレウス (*Corprinus cinerus*) 由来ペルオキシダーゼ（例えば、特公平03-1949参照）等がよく知られている。

【0007】

ペルオキシダーゼの産業上の利用については、幅広い提案が既になされているが、その中には、各種有機化合物の分解プロセスに使用することも含まれる。たとえば、製紙用パルプの製造プロセスでの利用や纖維染料の漂白・分解を目的とする利用等である。尚、上述の作用機作に基づき、これらの公知の方法においては、ペルオキシダーゼは、通常過酸化水素または現場において過酸化水素を発生しうる化合物や酵素系と一緒に使用される。

【0008】

纖維染料の漂白・分解という観点から見た場合、ペルオキシダーゼは、染料移動阻止剤および纖維染料の漂白剤としての利用が提案されている。ここで、“染料移動阻止”とは、例えば特許掲載公報第2801398号に記載されたような布の洗浄中に染色された布から他の布への纖維染料の移動阻止からなるプロセスであるが、この染料移動の問題は、染料が洗濯の間に滲出する暗色の布と白色または淡色布と一緒に洗濯する場合に重要である。さらに、溶液または分散液中の纖維染料に対するペルオキシダーゼの漂白作用に基づいて、該酵素が纖維工業からの排水処理に有効であると期待されている。また、ペルオキシダーゼのこれら能力は、過酸化水素と共に、活性化剤と称される染料以外の被酸化性基質、と組み合わせると、特に顕著になることも知られている。

【0009】

残念ながら、自然環境中における上記ペルオキシダーゼの活性レベルは、比較的非自然な洗浄や排水処理環境中で維持されないことがしばしばある。特に、反

応性（反応速度）、熱安定性、pH安定性、酸化安定性および基質特異性等のペルオキシダーゼが有する種々の特性が、該酵素の自然環境外での利用にとって必ずしも最適とは限らない。実際に、染料移動阻止および漂白に関して有効なペルオキシダーゼとして、西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ、大豆由来ペルオキシダーゼ、または、コルプリヌス・シネレウス由来ペルオキシダーゼのような細菌・酵母・糸状菌のような微生物により產生されるペルオキシダーゼが既に提案されているが、いずれも実用的な活性レベルには達していない。特に、纖維染料の移動が起り易いのは、40℃以上で洗浄を行った場合であるが、この温度において優れた反応性と安定性を示すペルオキシダーゼは、知られていない。

【0010】

今日の遺伝子工学の進歩により、タンパク質のアミノ酸配列中における特定のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換させることが可能であり、かつ、比較的容易になっている。そして、置換されるアミノ酸残基の位置、置換されたアミノ酸残基の化学的な性質や物理的な大きさ等に応じて、元の酵素の性能を様々な程度に変化させうるし、場合によっては、元の酵素を不活化させることすらある。ペルオキシダーゼについても、そのようなアプローチは可能であり、たとえば、特表平09-503664では、洗浄環境中での効力を増加させたペルオキシダーゼを取得するという目的で、コルプリヌス・シネレウス由来ペルオキシダーゼのアミノ酸配列を変化させて、その性能を改善することが試みられているが、残念ながら、十分な能力を獲得するには至っていない。

【0011】

また、ペルオキシダーゼを染料移動阻止や排水処理で利用するためには、ペルオキシダーゼ自体が低コストで製造される必要がある。すなわち、ペルオキシダーゼが多量に含有されており、入手し易く、豊富に存在し、かつ、それ自体が安価な材料からペルオキシダーゼを分離・精製・回収するか、細菌・酵母・カビなどの微生物に該酵素を効率よく生産させることが必須である。

【0012】

先に述べたように、ペルオキシダーゼは植物（組織）に広く存在しているので、その種類を問わず植物（組織）からの抽出が考えられる。その代表例として西

洋ワサビがよく知られているが、西洋ワサビは、ペルオキシダーゼは多量に含有されているものの、入手し易く、豊富に存在し、かつ、それ自体が安価な材料とは言い難い。

【0013】

また、近年の遺伝子工学的な手法の進歩により、細菌・酵母・糸状菌などの微生物にペルオキシダーゼを効率よく生産させることが可能になっている。その場合、該酵素生産時における宿主微生物の生育環境を厳密に制御することが、高い生産効率の維持並びに遺伝子組換え生物の封じ込めという観点から必須である。しかしながら、生育環境を厳密に制御するためには、高度に密閉され、かつ、殺菌が可能な専用の装置・機器やそれを格納するための専用施設が必要となるため、一般的には、低コストで製造することは必ずしも容易ではない。

【0014】

イネにもペルオキシダーゼが含まれており、特にイネモミガラ中に比較的多量のペルオキシダーゼが含まれていることが既に報告されている（日本作物学会東海支部研究発表梗概 第59巻・第6頁）。また、その精製方法（特公平5-22510）、並びに、植物成長促進剤としての利用方法（特公平7-91169）についての提案が既になされているが、染料移動阻止や漂白に関する利用についての報告はなされていない。

【0015】

【特許文献1】特公平3-1949号公報

【0016】

【特許文献2】特許第2801398号公報

【0017】

【特許文献3】特公平5-22510号公報

【0018】

【特許文献4】特公平7-91169号公報

【0019】

【非特許文献1】日本作物学会東海支部研究発表梗概 第59巻・第6頁

【0020】

【発明が解決しようとする課題】

以上の状況に鑑み、本発明の課題は、従来のペルオキシダーゼにはないより非自然な条件で活性の発現が可能なペルオキシダーゼを見出し、これを利用する方法を提供する事にある。

そして、本発明の目的は、洗濯またはすすぎ過程における染料移動阻止、並びに、溶液または分散液中の染料の漂白を伴なう繊維工業等での排水処理に対する有効な活性レベルに優れ、かつ、安価なペルオキシダーゼの利用を提供することである。

【0021】**【課題を解決するための手段】**

イネモミガラは、日本においては、年間約200万トン発生しており、その3割近くが焼却ないし廃棄されている（参考文献：バイオマス・エネルギー・環境アイピーシー）。すなわち、イネモミガラは、ペルオキシダーゼが多量に含有されており、入手し易く、豊富に存在し、かつ、それ自体が安価な材料である。

【0022】

驚くべきことに、本発明者らは、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼは、先に例示した西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ、大豆由来ペルオキシダーゼ、および、コルプリヌス・シネレウス由来ペルオキシダーゼと比較して、高温での反応性並びに安定性に優れていることを見出し、よって、染料移動阻止および漂白に関して有効な活性レベルを維持できるペルオキシダーゼであることを確認し、本発明を完成するに至った。また、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼは染色された布自体には何らの明らかな色分解を起こさないという重要な利点も併せて有していた。

【0023】

即ち、本発明は以下のとおりである。

[1] 洗液中で染色された布を含む複数の布と一緒に洗濯および／またはすすぐ場合において、染色された一方の布から他の布への繊維染料の移行を防止する方法であって、該洗液に過酸化水素の存在下でイネ由来ペルオキシダーゼを作用させることを特徴とする方法。

[2] 溶液または分散液中の纖維染料を漂白する方法であって、前記溶液または分散液に過酸化水素の存在下でイネ由来ペルオキシダーゼを作用させることを特徴とする方法。

[3] イネ由来ペルオキシダーゼが、イネモミガラ由来のペルオキシダーゼであることを特徴とする [1] または [2] のいずれか 1 項に記載の方法。

[4] 過酸化水素が過酸化水素前駆体としてまたは過酸化水素を発生しうる酵素系により供給されることを特徴とする [1] から [3] のいずれか 1 項に記載の方法。

[5] 過酸化水素前駆体が過ホウ酸塩または過炭酸塩である [4] に記載の方法。

[6] 活性化剤の存在下において実施することを特徴とする [1] から [5] のいずれか 1 項に記載の方法。

[7] 界面活性剤の存在下において実施することを特徴とする [1] から [6] のいずれか 1 項に記載の方法。

[8] 纖維染料が合成染料、天然染料又は天然同一性染料である [1] から [7] のいずれか 1 項に記載の方法。

[9] イネ由来ペルオキシダーゼ、並びに、過酸化水素、過酸化水素の前駆体、または、過酸化水素を発生せしめることのできる酵素系を含んでいる洗剤組成物もしくは漂白剤組成物。

【0024】

【発明の実施の形態】

以下本発明を詳細に説明する。

本発明は、洗液中で布と一緒に洗濯および／またはすすぐ場合において、染色した布から他の布への纖維染料の移行を防止する方法であって、前記布を洗濯しおよび／またはすすぐ洗液にイネ由来ペルオキシダーゼ、並びに、過酸化水素、過酸化水素前駆体または過酸化水素を発生しうる酵素系を実質的に同時に存在させることを特徴とする方法に関するものである。

【0025】

さらに、本発明は、溶液または分散液中の纖維染料を漂白する方法であって、

前記溶液または分散液にイネ由来ペルオキシダーゼ、並びに、過酸化水素、過酸化水素前駆体または過酸化水素を発生しうる酵素系を実質的に同時に存在させることを特徴とする方法に関するものである。

【0026】

本発明におけるイネ由来ペルオキシダーゼとは、同酵素を含有しているイネモミガラから分離・精製・回収されるイネモミガラ由来ペルオキシダーゼを代表例として挙げることができる。使用されるイネモミガラ由来ペルオキシダーゼは、精製の程度により該酵素と共に含まれる不純物の量や質が異なってくるが、好ましくはそのRZ値が0.01以上、より好ましくは0.1以上、さらに好ましくは1.0以上のものを使用すればよい。尚、ここでいうRZ値とは、275 nmと403 nmに於ける吸光度の比である ($A_{275\text{ nm}}/A_{403\text{ nm}}$)。この値は、ペルオキシダーゼ溶液中の蛋白質含量に対するヘム含量の比を表しており、ペルオキシダーゼの精製度の指標となる。

【0027】

また、近年のイネゲノム解析の成果等により、イネにおいても、複数のペルオキシダーゼ遺伝子の存在が報告されている (Chen ZHら; Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai) 2001;33(2):163-172)。すなわち、今日の遺伝子工学的な手法を利用すれば、これらのイネ由来のペルオキシダーゼをコードするDNA配列と、該ペルオキシダーゼをコードするDNA配列の発現を目的とする機能を有するDNA配列を結合させた組換えDNA分子を構築し、続いて該組換えDNA分子で宿主細胞や宿主植物体を形質転換して、イネ由来ペルオキシダーゼを効率良く生産させることも可能である。以上のような技術的な背景を踏まえた場合、形質転換された宿主細胞を培養し、もしくは、形質転換された宿主植物体を生育させて、得られた培養物、培養細胞、もしくは植物体からペルオキシダーゼを分離・精製・回収することにより得られるイネ由来ペルオキシダーゼも、本発明のイネ由来ペルオキシダーゼの範疇に含まれるものとする。

【0028】

本発明におけるイネ由来ペルオキシダーゼの形態についての制限は特にないが、洗剤組成物や漂白剤組成物の成分として添加される場合を考慮すれば、無粉塵

性顆粒や液体酵素製剤の形態であることが好ましい。尚、無粉塵性顆粒の場合は、米国特許第4, 106, 991号公報および第4, 661, 452号公報に記載のように作られ、そして場合により当該技術で公知の方法により被覆することができる。また、液体酵素製剤の場合は、確立された方法にしたがってポリオールたとえばプロピレングリコール、糖または糖アルコール、乳酸またはホウ酸等を加えることにより安定化させることができる。

【0029】

本発明における洗液中で布と一緒に洗濯および／またはすすぐ場合、または、溶液または分散液中の纖維染料を漂白する場合においては、洗液や漂白液1リットル当たり0. 001mgから1000mgのイネ由来ペルオキシダーゼを添加すればよい。さらに、その温度は、10℃から80℃の範囲、好ましくは20℃から70℃の範囲、より好ましくは20℃から60℃の範囲で実施すればよい。さらに、洗液や漂白液のpHは、一般的pH、洗濯および／またはすすぐ場合の一般的なpH、すなわちpH6. 5～10. 5、好ましくはpH6. 5～9. 5、より好ましくはpH7. 5～9. 5で実施すればよい。

【0030】

本発明における洗濯またはすすぎ過程における染料移動阻止、並びに、溶液または分散液中の染料の漂白を行う場合においては、イネ由来ペルオキシダーゼと過酸化水素が実質的に同時に存在していることが必須である。この際、過酸化水素は洗濯および／またはすすぐプロセスの初め又は途中で、0. 001～5mM、好ましくは0. 01～1mMの量で存在させればよい。

【0031】

過酸化水素の供給に際しては、過酸化水素自体が添加されてもよいし、現場において過酸化水素を発生する過酸化水素前駆物質として供給されてもよい。その様な過酸化水素前駆物質として、具体的には、過ホウ酸塩、過炭酸塩、ペルオキシカルボン酸、またはその塩を挙げられる。さらに、過酸化水素供給源として、現場において過酸化水素を発生させる過酸化水素生成酵素系を選択してもよい。好ましい過酸化水素生成酵素系は、洗剤組成物へ都合良く含まれる安価で容易に入手可能な基質に作用するものである。このような基質の例としてはグルコース

であり、これはグルコースオキシダーゼを用いることにより過酸化水素を供給することができる。他の適当なオキシダーゼは尿酸オキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、アミンオキシダーゼ、アミノ酸オキシダーゼおよびコレステロールオキシダーゼである。

【0032】

本発明における洗濯またはすすぎ過程における染料移動阻止、並びに、溶液または分散液中の染料の漂白を行う場合においては、使用するイネ由来ペルオキシダーゼの染料移動阻止および漂白効果が強化するために、別の酸化性基質を共存させてもよい。これらの酸化性基質は、一般に活性化剤と称され、p-ヨードフェノール、L-アスコルビン酸、p-アミノフェノール、p-アミノ安息香酸基質などが具体例として挙げられるが、これらに限られたものではない。また、共存させるべき酸化性基質の量は、約 $1\text{ }\mu\text{M}$ ~ 10 mM 、より好ましくは、約 $10\text{ }\mu\text{M}$ ~ 1 mM の間が適当である。

【0033】

本発明における洗濯またはすすぎ過程における染料移動阻止、並びに、溶液または分散液中の染料の漂白を行う場合においては、陰イオン界面活性剤、非イオン界面活性剤、陽イオン界面活性剤、両性界面活性剤ならびにこれら界面活性剤の混合物が共存していてもよい。このような界面活性剤の例としては、アルキルベンゼンスルホン酸塩（LAS：陰イオン界面活性剤）、 α -オレフィンスルホン酸塩（AOS：陰イオン界面活性剤）、硫酸アルキルポリオキシエチレン塩（AES：陰イオン界面活性剤）ドデシル硫酸ナトリウム（SDS：陰イオン界面活性剤）ラウリン酸ナトリウムのような長鎖脂肪酸塩（石けん：陰イオン界面活性剤）、Brij 35（非イオン界面活性剤）、アルキルポリオキシエチレンエーテル（非イオン界面活性剤）、アルキルトリメチルアンモニウム塩（陽イオン界面活性剤）、ジアルキルジメチルアンモニウム塩（陽イオン界面活性剤）、ジメチルアルキルアミノキシド（両性界面活性剤）などが挙げられるが、これらに限られたものではない。また、共存させるべき界面活性剤の量は、特に制限はないが、各界面活性剤の臨界ミセル濃度（CMC）以上が好ましい。

【0034】

本発明においてイネ由来ペルオキシダーゼにより染料移動阻止および漂白の対象となる繊維染料については特に制限はなく、通常使用される繊維染料に対して効果を発揮する。尚、ここでいう繊維染料とは、天然染料はいうまでもなく、合成的に作られるがただし構造および特性は天然染料と同じである天然同一性染料、一般的なアゾ染料をはじめとして、アントラキノン染料などその他の合成染料を挙げることができる。

【0035】

最後に、本発明は、イネ由来ペルオキシダーゼ、並びに、過酸化水素、過酸化水素の前駆体、または、過酸化水素を発生せしめることのできる酵素系を含んでいる洗剤組成物もしくは漂白剤組成物に関する。

【0036】

この洗剤組成物中もしくは漂白剤組成物中のイネ由来ペルオキシダーゼ量については、特に制限はないが、好ましくは、洗液もしくは漂白液1リットル当たり0.001mgから1000mgのイネ由来ペルオキシダーゼを含有させればよい。さらに、その形態についても、目的に都合の良いように紛体または液体いずれかの形態を選択すればよい。具体的には、上述のような無粉塵性顆粒や種々の安定剤により安定化された液体酵素製剤ができる。また、過酸化水素、または、その供給を目的とする成分との共存が必須であるが、そのために、上述のような過酸化水素前駆物質や過酸化水素生成酵素系を選択してもよい。

【0037】

一方、本発明における洗剤組成物中もしくは漂白剤組成物中には、上述のような活性化剤や界面活性剤を含んでいてもよい。

さらに、洗剤組成物を目的とする場合には、さらに当該技術での公知となっている他の洗剤成分、たとえば、ビルダー、抗腐蝕剤、金属イオン封鎖剤、抗一よされ再付着剤、芳香剤、酵素安定剤等、他の洗剤酵素（たとえばプロテアーゼ、リバーゼまたはアミラーゼ）を含んでもよい。

【0038】

本発明の洗剤組成物が添加された洗液もしくは漂白剤組成物が添加された漂白液のpHは、6.5～12であり、好ましくは、6.5～10.5である。

【0039】

【実施例】

次に、本発明について、以下の実施例に基づきさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に制限されるものではない。

【0040】

[実施例1] イネモミガラ由来ペルオキシダーゼの温度と反応速度

オレンジIIを基質とした退色反応により、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼの温度と反応速度の関係について検討した。

日立製紫外可視分光光度計U-2010のセル内（光路1cm）に、 $100\text{ }\mu\text{M}$ オレンジIIおよび 680 nM のイネモミガラ由来ペルオキシダーゼを含む 0.1 M Tris-HCl 緩衝溶液(pH 9.0) 1mLを加え、各温度で10分間プレインキュベートした後、予め同じ温度にてプレインキュベートしておいた 1.5 mM 過酸化水素水を1mL注入して反応を開始し、オレンジIIの最大吸収波長である 485 nm の経時的な吸光度の変化を測定した。

尚、イネモミガラ由来ペルオキダーゼは、フナコシ株式会社より販売されているイネモミガラ由来ペルオキダーゼ（商品番号K0310100：純度RZ>1.2）を使用した。また、同酵素のモル吸光係数は、西洋ワサビと同じく $1.02 \times 10^5\text{ mol}^{-1}\text{ dm}^3\text{ cm}^{-1}$ (403 nm) とした。また、オレンジIIは、和光純薬製の試薬を再結晶法で精製し、ロ紙分配クロマトグラムとUVスペクトルで純度を確認して使用した。

このオレンジIIの退色曲線から、反応速度式を解析した結果、退色反応はいずれの場合も擬一次反応で進行することが明らかとなった。そこで、以下の式(1) (数1)

【0041】

【数1】

$$\text{式 (1)} \quad \ln(C_0/C_t) = k_t t$$

(ここで、 k_t (min^{-1}) は擬一次速度定数、 C_0 はオレンジIIの初濃度、 C_t は反応時間 t におけるオレンジIIの濃度である。) に示す擬一次反応速度式からオレンジIIの退色反応における温度と速度定数 k_t の関係を求め、そ

の結果を以下の表-1（表1）に示した。

【0042】

【表1】

表-1

反応温度	k_t
20℃	1.52
30℃	2.28
40℃	3.84
50℃	5.81
60℃	7.70
70℃	10.10
80℃	11.00

【0043】

また、次の比較例1で示す西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ、コルプリヌスシネレウス (*Corprinus cinerus* : 旧名 *Arthromyces ramosus*) 由来ペルオキシダーゼ、大豆ペルオキシダーゼに関する同様の結果（表-2）の温度と速度定数 k_t の関係と、本実施例におけるイネモミガラ由来ペルオキシダーゼの温度と速度定数 k_t の関係について、図-1（図1）のように比較を行った。

その結果、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼは、他のペルオキシダーゼと比較した場合、高温での反応性並びに安定性に優れていることが判明した。

【0044】

[比較例1] 種々のペルオキシダーゼの温度と反応速度

オレンジIIを基質とした退色反応により、西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ、コルプリヌスシネレウス (*Corprinus cinerus* : 旧名 *Arthromyces ramosus*) 由来ペルオキシダーゼ、大豆ペルオキシダーゼの温度と反応速度の関係について

検討した。

使用するペルオキシダーゼとして西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ、コルプリヌス シネレウス由来ペルオキシダーゼ、大豆ペルオキシダーゼを用いた以外は、実施例1と同一の方法と条件にて測定を行い、温度と速度定数 k_t の関係を求め、その結果を以下の表-2（表2）に示した。

尚、西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼは和光純薬製の試薬（R. Z. = 2. 65）、コルプリヌス・シネレウス由来ペルオキシダーゼはSigma社製の試薬（R. Z. = 2. 32）、および、大豆ペルオキシダーゼはSigma社製の試薬（R. Z. = 1. 11）を使用した。また、各酵素のモル吸光係数は、 $1.02 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ (403 nm)とした。

また、本比較例1と実施例1の結果について、図-1（図1）のように比較を行った。

【0045】

【表2】

表-2

反応温度	西洋ワサビ	コルプリヌス シネレウス	大豆
20℃	1. 89	1. 42	0. 25
30℃	2. 40	2. 30	0. 40
40℃	3. 18	3. 58	0. 53
50℃	3. 78	3. 32	0. 88
60℃	4. 26	0. 34	1. 03
70℃	4. 40	-	1. 03

【0046】

【実施例2】 活性化剤（p-ヨードフェノール）の添加効果

オレンジIIを基質とした退色反応において、活性化剤（p-ヨードフェノール）共存下でのイネモミガラ由来ペルオキシダーゼの温度と反応速度の関係について検討した。

日立製紫外可視分光光度計U-2010のセル内（光路1cm）に、 $100 \mu \text{M}$ オレンジII、 $100 \mu \text{M}$ p-ヨードフェノール、および、 680 nM のイネ

モミガラ由来ペルオキシダーゼを含む0. 1M Tris-HCl緩衝溶液（pH 9. 0）1mLを加え、各温度で10分間プレインキュベートした後、予め同じ温度にてプレインキュベートしておいた1. 5 mM過酸化水素水を1mL注入して反応を開始し、実施例1と同様に、オレンジIIの退色曲線から、温度と速度定数k_tの関係を求め、その結果を以下の表-3（表3）に示した。また、本結果と実施例1の結果（表-1）より、p-ヨードフェノールの添加効果について比較した（図-2）（図2）。

すなわち、活性化剤（=p-ヨードフェノール）の添加により、各温度で反応速度が1. 3～1. 5倍増大することが判明した。

【0047】

【表3】

表-3

反応温度	k _t
20℃	2. 42
30℃	2. 64
40℃	5. 32
50℃	8. 23
60℃	10. 50
70℃	15. 10

【0048】

[実施例3] 各種色素の退色速度定数の比較

イネモミガラ由来ペルオキシダーゼによる各種色素の退色反応について、活性化剤（p-ヨードフェノール）の共存下・非共存下で検討した。

日立製紫外可視分光光度計U-2010のセル内（光路1cm）に、以下の表-4に示した各種色素100μM、および、680nMのイネモミガラ由来ペルオキシダーゼを含む0. 1M Tris-HCl緩衝溶液（pH 9. 0）1mLを加え、20℃で10分間プレインキュベートした後、予め同じ温度にてプレインキュベートしておいた1. 5 mM過酸化水素水を1mL注入して反応を開始し、実施例1と同様に、各種色素の退色曲線から、速度定数k_tの関係を求め、その結果を以下の表-4に示した。尚、p-ヨードフェノールを添加した場合は、

100 μMとなるように0.1M Tris-HCl緩衝溶液(pH9.0)に添加した。

実験の結果、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼの各種色素に対する退色効果が確認され、特に活性化剤の存在下で顕著であった。

【0049】

【表4】

表-4

反応温度	測定波長	p-ヨードフェノール	
		添加なし(k_t)	添加あり(k_t)
オレンジII	485.0 nm	1.52	2.42
オレンジI	481.0 nm	12.9	24.3
オレンジG	476.0 nm	0.0603	0.574
トロベオリンO	427.8 nm	0.0653	0.2
アリザリンイエローR	372.3 nm	0.0434	—
アリザリンレッドS	516.0 nm	0.395	70.6
カルコン	635.6 nm	34.2	65.5

【0050】

[実施例4] 各種活性化剤の添加効果の比較

イネモミガラ由来ペルオキシダーゼによるオレンジIIの退色反応について、各種活性化剤の添加効果について検討した。

日立製紫外可視分光光度計U-2010のセル内(光路1cm)に、オレンジII 100 μM、以下の表-5に示した各種活性化剤 100 μM、および、680 nMのイネモミガラ由来ペルオキシダーゼ、を含む0.1M Tris-HCl緩衝溶液(pH9.0) 1mLを加え、20℃で10分間プレインキュベートした後、予め同じ温度にてプレインキュベートしておいた1.5 mM過酸化水素水を1mL注入して反応を開始し、実施例1と同様に、オレンジIIの退色曲線から、速度定数 k_t の関係を求め、その結果を以下の表-5(表5)に示した。

実験の結果、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼによるオレンジIIの退色反応における各種活性化剤の添加効果が確認された。

【0051】

【表5】

表-5

活性化剤	k_t
無添加	1.52
p-ヨードフェノール	2.42
L-アスコルビン酸	1.90
p-アミノフェノール	1.67
p-アミノ安息香酸	1.65
グルタチオン（還元型）	1.27
D-グルコース	1.57

【0052】

[実施例5] 活性化剤 (=p-ヨードフェノール) 濃度の検討

イネモミガラ由来ペルオキシダーゼによるオレンジIIおよびオレンジGを基質とした退色反応において、活性化剤 (p-ヨードフェノール) 濃度の影響について検討した。

日立製紫外可視分光光度計U-2010のセル内 (光路1cm) に、100 μ MオレンジII (またはオレンジG)、以下の表-6に示す濃度のp-ヨードフェノール、および、680nMのイネモミガラ由来ペルオキシダーゼを含む0.1M Tris-HCl緩衝溶液 (pH 9.0) 1mLを加え、20℃で10分間プレインキュベートした後、予め同じ温度にてプレインキュベートしておいた1.5 mM過酸化水素水を1mL注入して反応を開始し、実施例1と同様に、オレンジIIの退色曲線から、p-ヨードフェノール濃度と速度定数 k_t の関係を求め、その結果を以下の表-6 (表6) に示した。尚、オレンジIIは、485nmの吸光度変化を、オレンジGは、476nMの吸光度変化をそれぞれ測定した。

その結果、種々のp-ヨードフェノール濃度下でのイネモミガラ由来ペルオキシダーゼによるオレンジII及びオレンジGの退色効果が確認された。

【0053】

【表6】

表-6

p-ヨードフェノール濃度	k_t	
	オレンジII	オレンジG
1000 μM	3.89	2.42
200 μM	3.71	2.21
100 μM	2.42	0.56

【0054】

[実施例6] 界面活性剤添加の影響

イネモミガラ由来ペルオキシダーゼによるオレンジIIを基質とした退色反応において、界面活性剤を添加した場合の影響について検討した。

日立製紫外可視分光光度計U-2010のセル内（光路1cm）に、100 μM オレンジII、以下の表-7に示す界面活性剤、および、680 nMのイネモミガラ由来ペルオキシダーゼを含む0.1M Tris-HCl緩衝溶液（pH 9.0）1mLを加え、20℃または60℃で10分間プレインキュベートした後、予め同じ温度にてプレインキュベートしておいた1.5 mM過酸化水素水を1mL注入して反応を開始し、実施例1と同様に、オレンジIIの退色曲線から速度定数 k_t を求め、その結果を以下の表-7（表7）に示した。尚、各界面活性剤の添加量は、反応時の濃度が臨界ミセル濃度（CMC）の1.5倍濃度となるように調整した。

その結果、各種界面活性剤の存在下においても、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼによるオレンジIIの退色効果が確認された。

【0055】

【表7】

表-7

界面活性剤（種別）	濃度（終濃度）	k _t	
		20℃	60℃
無添加区	-	1. 52	7. 70
ドデシル硫酸ナトリウム (SDS:陰イオン界面活性剤)	8. 55 mM	1. 20	6. 72
アルキルベンゼンスルホネート (LAS:陰イオン界面活性剤)	7. 35 mM	1. 26	8. 38
Brij 35 (非イオン界面活性剤)	90 μM	1. 29	7. 46
ラウリン酸ナトリウム (石けん)	10. 1 mM	1. 43	5. 73

【0056】

[実施例7] モデル洗剤系での効果

モデル洗剤系でのイネモミガラ由来ペルオキシダーゼによるオレンジIIを基質とした退色効果について検討した。

日立製紫外可視分光光度計U-2010のセル内（光路1cm）に、100 μMオレンジII、以下に示す組成のモデル洗剤成分、および、680 nMのイネモミガラ由来ペルオキシダーゼを含む0. 1 M Tris-HCl緩衝溶液(pH 9. 0) 1 mLを加え、20℃、40℃、または60℃で10分間プレインキュベートした後、予め同じ温度にてプレインキュベートしておいた1. 5 mM過酸化水素水を1 mL注入して反応を開始し、実施例1と同様に、オレンジIIの退色曲線から速度定数k_tを求め、その結果を以下の表-8（表8）に示した。

尚、モデル洗剤における各成分（終濃度）は以下のとおりである。

【0057】

- ・ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)；8. 6 mM
- ・過炭酸ナトリウム；2. 8 μM
- ・亜硫酸ナトリウム；1. 8 mM
- ・メタケイ酸ナトリウム；4. 1 μM
- ・EDTA；59 μM
- ・カルボキシメチルセルロース；0. 0001%

すなわち、モデル洗剤系での、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼによるオレンジIIの退色効果が、各温度で確認された。

【0058】

【表8】

表-8

洗浄温度	k_t
20℃	1.43
40℃	3.77
60℃	4.16

【0059】

[実施例8] 試験布への移染防止効果（1）

イネモミガラ由来ペルオキシダーゼによる試験布への移染防止効果について、オレンジIIをモデル纖維染料とした系にて検討した。

衣生活研究会の実験用ナイロン白生地を容量比1:1のメタノール-水混合溶液中で水溶性成分を除去した後、風乾し、ついでベンゼンで油性成分を除去し、風乾した。以後、これを試験布として使用した。

試験布0.2gをバイアル瓶に入れ、最終の浴比が1:50となるようにイネモミガラ由来ペルオキシダーゼ(360nM)と過酸化水素(790μM)を含む50mMTris-HCl衝溶液(pH9.0)9.5mLを加え、20℃にて攪拌を開始した。つぎに、バイアル瓶に1mMオレンジII水溶液を0.5mL加え、20℃で30分間反応を行った。反応後、取り出した試験布を風乾した。続いて、移染防止実験を行った後のオレンジIIの試験布への着色の度合いを表すために、ミノルタ製色彩色差計CR-300を用いて色差(△E)を測定した。

尚、ここでいう色差(△E)とは、国際照明委員会(CIE)による感覚的表色法の色相、明度、彩度の3属性ではなく色の感覚を定量的に表示するために定義している数値を示す。すなわち、色差(△E)のパラメータであるL、a、bを色差計を用いて測定し、以下に示すHunterの色差式(数2)により△Eを算出することができる。

【0060】

【数2】

$$\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}$$

$$\Delta L = L_0 - L_w, \Delta a = a_0 - a_w, \Delta b = b_0 - b_w$$

(式中、 L_0 、 a_0 、 b_0 は処理前の試験布の L 、 a 、 b 値を示し、 L_w 、 a_w 、 b_w は処理後の試験布の L 、 a 、 b 値を示す。)

また、比較例として、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼを添加しない系でも同様の検討を行った。さらに、上記の系に界面活性剤として、アルキルベンゼンスルホネート（LAS：陰イオン界面活性剤）、または、ラウリン酸ナトリウム（石けん）を終濃度がそれぞれ7.35 mMまたは10.1 mMとなるように添加した場合についても検討を行った。以下の表-9（表9）にそれぞれの試験区の結果をまとめた。

下記に示すとおり、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼの添加により試験布へのオレンジIIの移染が防止された。また、LAS、または、ラウリン酸ナトリウムの存在下でも移染防止効果が確認された。

【0061】

【表9】

表-9

イネモミガラ由来 ペルオキシダーゼ	界面活性剤	色差 (ΔE)
添加	無添加	1.19 ± 0.38
無添加	無添加	10.60 ± 0.58
添加	LAS	0.65 ± 0.08
添加	ラウリン酸ナトリウム	0.61 ± 0.03

【0062】

[実施例9] 試験布への移染防止効果(2)

SDS共存下でのイネモミガラ由来ペルオキシダーゼによる試験布への移染防止効果について、オレンジIIをモデル繊維染料とした系にて検討した。

実施例8で調製した試験布0.2 gをバイアル瓶に入れ、最終の浴比が1:5

0となるようにイネモミガラ由来ペルオキシダーゼ（360nM）、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS：9.0mM）、過酸化水素（790μM）を含む50mMTris-HCl衝溶液（pH9.0）9.5mLを加え、20℃、または、60℃にて攪拌を開始した。つぎに、バイアル瓶に1mMオレンジII水溶液を0.5mL加え、20℃、または、60℃にて30分間反応を行った。

反応後、取り出した試験布を風乾し、実施例8と同様に色差（△E）を測定した結果、以下の表-10（表10）のようになった。尚、比較例として、SDS、または、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼを添加しない系でも同様の検討を行った。

その結果、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼの添加により試験布へのオレンジIIの移染が防止された。また、SDSの共存下では、移染防止の相乗効果が確認された。

【0063】

【表10】

表-10

イネモミガラ由来 ペルオキシダーゼ	SDS	色差（△E）：20℃	色差（△E）：60℃
添加	添加	0.35±0.02	0.91±0.45
添加	無添加	1.19±0.38	2.43±0.15
無添加	添加	2.30±0.33	4.92±0.32
無添加	無添加	10.60±0.58	（データなし）

【0064】

[実施例10] 試験布への移染防止効果（3）

Brij35の共存下でのイネモミガラ由来ペルオキシダーゼによる試験布への移染防止効果について、オレンジIIをモデル纖維染料とした系にて検討した。

実施例8で調製した試験布0.2gをバイアル瓶に入れ、最終の浴比が1:50となるようにイネモミガラ由来ペルオキシダーゼ（360nM）、Brij35（95μM）、過酸化水素（790μM）を含む50mMTris-HCl衝溶液（pH9.0）9.5mLを加え、20℃、または、60℃にて攪拌を開始

した。つぎに、バイアル瓶に1 mMオレンジII水溶液を0.5 mL加え、20°C、または、60°Cにて30分間反応を行った。

反応後、取り出した試験布を風乾し、実施例8と同様に色差(ΔE)を測定した結果、以下の表-11(表11)のようになった。尚、比較例として、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼを添加しない系でも同様の検討を行った。

すなわち、Brij35の共存下でのイネモミガラ由来ペルオキシダーゼによる試験布へのオレンジIIの移染防止効果が確認された。

【0065】

【表11】

表-11

イネモミガラ由来 ペルオキシダーゼ	色差(ΔE): 20°C	色差(ΔE): 60°C
添加	0.96 ± 0.09	3.71 ± 0.42
無添加	7.18 ± 0.61	19.10 ± 0.67

【0066】

【実施例11】 モデル洗剤系での移染防止効果

モデル洗剤成分共存下でのイネモミガラ由来ペルオキシダーゼによる試験布への移染防止効果について、オレンジIIをモデル繊維染料とした系にて検討した。

実施例8で調整した試験布0.2 gをバイアル瓶に入れ、最終の浴比が1:50となるようにイネモミガラ由来ペルオキシダーゼ(360 nM)とモデル洗剤成分(組成と終濃度は実施例7と同じ)を混合した水9.5 mLを加え、20°Cにて攪拌を開始した。つぎに、バイアル瓶に1 mMオレンジII水溶液を0.5 mL加え、20°Cにて30分間反応を行った。

反応後、取り出した試験布を風乾し、実施例8と同様に色差(ΔE)を測定した結果、以下の表-12(表12)のようになった。尚、比較例として、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼおよびモデル洗剤成分を添加しない系(単純な水系)でも同様の検討を行った。

すなわち、モデル洗剤成分共存下でのイネモミガラ由来ペルオキシダーゼによ

る試験布へのオレンジIIの移染防止効果が確認された。

【0067】

【表12】

表-12

イネモミガラ由来 ペルオキシダーゼ	モデル洗剤成分	色差 (ΔE)
添加	添加	0. 27 ± 0. 04
無添加	無添加	13. 70 ± 0. 61

【0068】

【実施例12】 染色布の色落作用（1）

イネモミガラ由来ペルオキシダーゼによる染色布の色落作用について、オレンジIIをモデル纖維染料とし、洗浄温度を20℃とした場合について、検討した。

ナイロン布をオレンジII 2%（対纖維重量）、酢酸10%（対纖維重量）、無水硫酸ナトリウム10%（対纖維重量）を含み、かつ、浴比が1:50の水溶液に入れ、該水溶液を室温から15分間で90℃に昇温した。その後15分間染色処理し、水洗後風乾し、染色布（原布）とした。

バイアル瓶に過酸化水素（終濃度で750μM）、および、以下の表-13に示す成分を含む水溶液10.0mLを加え、20℃にて攪拌を開始した。つぎに、染色布0.2g（最終の浴比が1:50）を入れ、20℃で攪拌を続けた。30分後、染色布を取り出し、原布に対する色差（ ΔE ）を実施例8と同様に測定した。その結果を以下の表-13（表13）にまとめた。

すなわち、20℃において、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼは、染色布に対する色落ち作用を示さなかった。

【0069】

【表13】

表-13

イネモミガラ由来 ペルオキシダーゼ (終濃度)	界面活性剤 (終濃度)	緩衝成分(終濃度)	色差(ΔE)
無添加	無添加	無添加 [水のみ]	0. 615
無添加	無添加	T r i s - H C 1 (50 mM)	0. 583
添加 (340 nM)	無添加	T r i s - H C 1 (50 mM)	0. 710
添加 (340 nM)	S D S (8. 55 mM)	T r i s - H C 1 (50 mM)	0. 601
添加 (340 nM)	B r i j 3 5 (90 μ M)	T r i s - H C 1 (50 mM)	0. 767
添加 (340 nM)	モデル洗剤成分 (実施例7参照)	無添加 [水のみ]	0. 275

【0070】

[実施例13] 染色布の色落ち作用(2)

イネモミガラ由来ペルオキシダーゼによる染色布の色落ち作用について、オレンジIIをモデル繊維染料とし、洗浄温度を60°Cとした場合について、検討した。

バイアル瓶に過酸化水素(終濃度で750 μ M)、および、以下の表-14に示す成分を含む水溶液10.0 mLを加え、60°Cにて攪拌を開始した。つぎに、染色布0.2 g(最終の浴比が1:50)を入れ、60°Cで攪拌を続けた。30分後、染色布を取り出し、原布に対する色差(ΔE)を実施例8と同様に測定した。その結果を以下の表-14(表14)にまとめた。

実験の結果、60°Cでは、SDS及びT r i s - H C 1緩衝剤による染色布に対する色落ち作用が示されたが、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼを添加しても、染色布に対する色落ち作用は増幅されなかった。

【0071】

【表14】

表-14

イネモミガラ由来 ペルオキシダーゼ (終濃度)	界面活性剤 (終濃度)	緩衝成分 (終濃度)	色差 (ΔE)
無添加	無添加	無添加 [水のみ]	1. 23
無添加	無添加	Triis-HCl (50 mM)	14. 43
添加 (340 nM)	無添加	Triis-HCl (50 mM)	14. 51
無添加	SDS (8. 55 mM)	Triis-HCl (50 mM)	18. 00
添加 (340 nM)	SDS (8. 55 mM)	Triis-HCl (50 mM)	17. 88

【0072】

【発明の効果】

洗濯またはすすぎ過程における染料移動阻止、並びに、溶液または分散液中の纖維染料の漂白を伴なう纖維工業等での排水処理に関して、反応性と安定性に優れ、かつ、安価なペルオキシダーゼが提供される。

【図面の簡単な説明】

【図1】

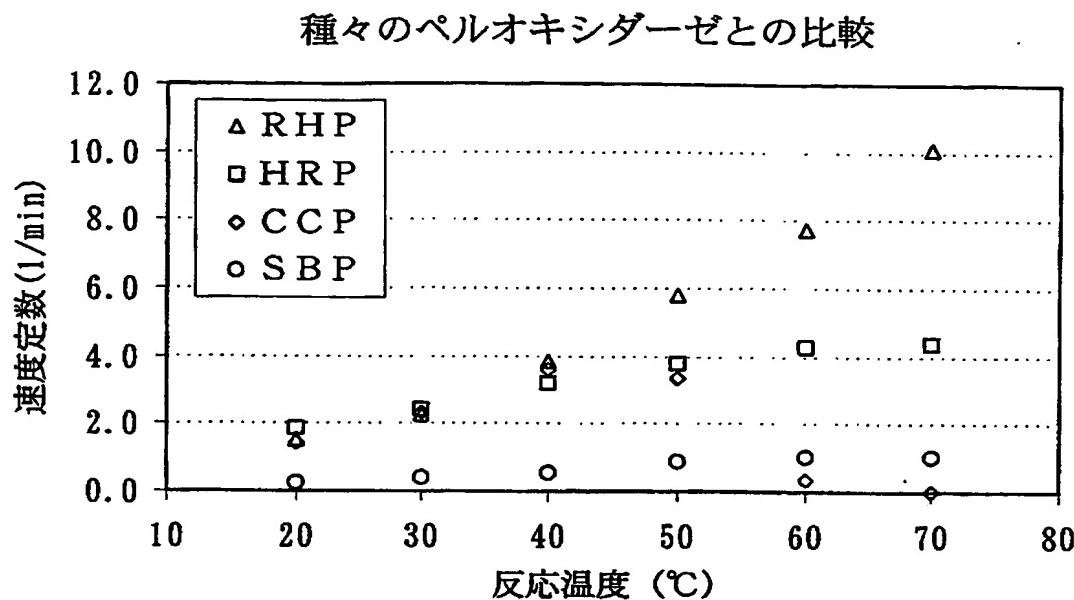
種々ペルオキシダーゼの温度と反応速度の関係についての比較結果を示す。図中、RHPはイネモミガラ由来ペルオキシダーゼを、HRPは西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼを、CCPはコルプリヌス・シネレウス由来ペルオキシダーゼを、SBPは大豆由来ペルオキシダーゼをそれぞれ示す。

【図2】

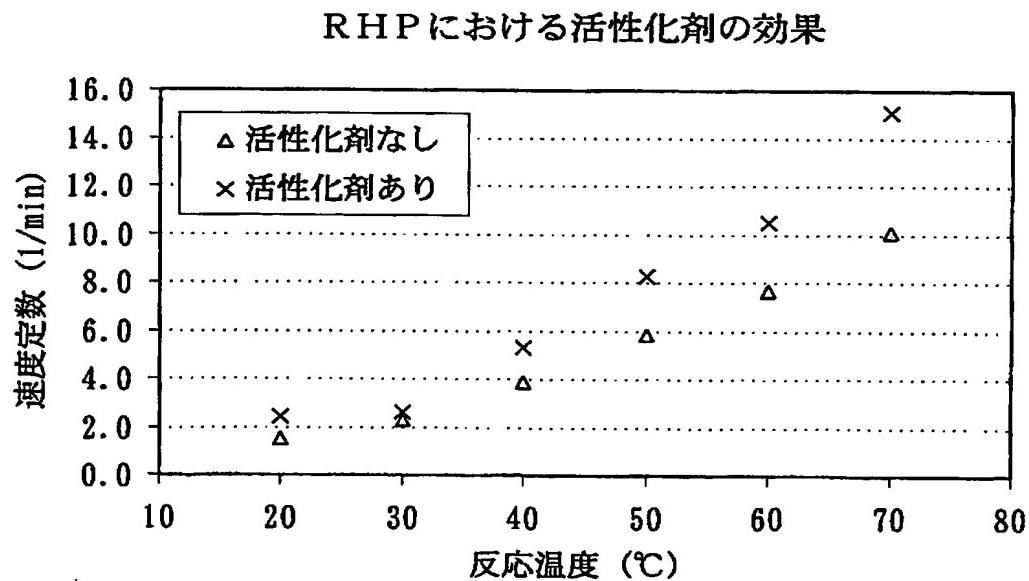
イネモミガラ由来ペルオキシダーゼによるオレンジIIの退色反応における活性化剤(p-ヨードフェノール)の添加効果を示す。図中、RHPはイネモミガラ由来ペルオキシダーゼを示す。

【書類名】 図面

【図1】



【図2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 高温での反応性並びに安定性に優れているイネ由来ペルオキシダーゼ、特に、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼの利用方法を提供する。

【解決手段】 イネ由来ペルオキシダーゼを用いて洗液中の着色物質（染料など）の分解（脱色・漂白）する。より具体的には、染色布ともう1つの布を同一の洗液中で一緒に洗った場合、または、すぐ場合の染色布からもう1つの布への繊維染料の移染を阻害する。また、溶液または分散液中の繊維染料を漂白する。

【選択図】 なし

特願2002-294528

出願人履歴情報

識別番号 [000005887]

1. 変更年月日 1997年10月 1日

[変更理由] 名称変更

住 所 東京都千代田区霞が関三丁目2番5号
氏 名 三井化学株式会社